

这方面工作较完整。发现氧同位素随酒的存放时间长短呈有规律的变化。和其他食品一样,不同种类的酒各有自己特征的同位素成分,而

工业合成的酒精与粮酿白酒碳同位素成分明显不同,表9所列部分酒的同位素数据正好说明了这点。

液态多酶协同水解发酵增香法酿造酱油

贵阳生物工程研究所 邹 亮 徐贤娟

摘 要

液态多酶协同水解发酵增香法酿造酱油新工艺中应用了现代生物工程技术。主要优点之一是原料中主要营养成分蛋白质利用率90~91%、淀粉质利用率95~96%;之二是新工艺中砍掉了蒸煮工序,这一重大技术改进首先是大大节省了能耗,这对当今世界面临能源危机,尽可能节省能耗具有重大意义;其次是省去了蒸煮设备的投资,降低了生产成本,增加了经济效益。

液态多酶协同水解发酵增香法酿造的酱油,色香味体与传统方法酿造的优质酱油之色香味体相比毫不逊色。该酱油的酱香、酯香、醇香浓郁,风味独成一格,氨基酸种类齐全,全氮1.22~2.34克/100毫升、氨基酸态氮0.62~1.19克/100毫升,氨基酸生成率51%。

液态多酶协同水解发酵增香法酿造酱油的原料可以用豆饼、豆粕、大豆、黄豆、绿豆、蚕豆、豌豆、酱渣、醋渣、淀粉糖渣、小麦、麦麸、碎米、豆腐渣、薯干、薯渣、花生、荞麦、血粉、金针菇菌丝体、香菇菌丝体、蘑菇菌丝体等中的4~5种按一定的碳氮比要求配料。

液态多酶协同水解发酵增香法酿造酱油是用多种酶制剂入生物反应器内协同完成对原料的水解,继后人工接种4~6株耐盐的产香产酯产乳酸菌进行安全发酵增香一至二周。

前 言

液态多酶协同水解发酵增香法酿造酱油是以蛋白质原料为主,蛋白质原料的水解是否彻底直接关系到全氮利用率及企业的产值和利润等。采用液态多酶协同水解发酵增香法酿造酱油蛋白质利用率可达90~91%。国内目前有大中小型酱油酿造厂约3000个,年产酱油总量约

300万吨,据有关部门调查有近半数的酱油厂其产品只能达到国家轻工部颁布的三级酱油标准,不少酱油酿造厂原料蛋白质利用率约50%。分析测定酱渣中粗蛋白质含量高达22~28%。这实在是一个惊人的浪费。固态低盐法酿造酱油约20公斤便有1公斤酱渣(绝干物质计),全国总产300万吨酱油有副产物酱渣15万吨,15万吨酱渣如果有1/2平均含粗蛋白质按24%计,则7.5万吨酱渣中有1.8万吨粗蛋白质。如果再辅以约20万吨富含淀粉质和蛋白质的粗原料采用液态多酶协同水解发酵增香法可再酿造酱油约100万吨,按0.6元/公斤酱油计,则可增加产值6亿多元,扣除全部成本,至少可向国家和企业增加税利2亿多元。同时许多地方还有醋渣可供开发利用。

某些酱油厂常为不能提高蛋白质原料的利用率而苦恼。笔者认为此类酿酱厂有技术管理跟不上的因素,这属可克服因素。另一方面是固态发酵工艺方法本身存在着限制蛋白质充分水解利用的不利因素,属于难克服因素。如成曲入池后发酵过程中管理不当酱醅温度最高时可达65℃左右。我们的实验研究证明,一般酱油曲霉分泌的多种酶系(除淀粉酶系和氧化酶系外),特别是蛋白酶系和肽酶系处在超过55℃条件下则很快失去水解底物的能力;再就是在含盐10~12%的浓度下,各种酶系经过15小时左右约有80%失去水解底物的能力;与此同时淀粉酶系的水解产物如各种糖分在半固态或固态条件下,局部糖分的浓度相当大,尤其对蛋白酶系和肽酶系产生严重的抑制作用。

深入分析研究早已形成的酱油酿造方法,

不难发现它们都可分为前期水解阶段和后期发酵增香阶段。液态多酶协同水解发酵增香法酿造酱油的基本原理仍是建立在传统制曲法酿造酱油的基础上的。液态多酶协同水解发酵增香法酿造酱油其水解阶段依靠的是添加多种酶制剂中所含的蛋白酶系、肽酶系、谷氨酰胺酶系、淀粉酶系、果胶酶系、半纤维素酶系、纤维素酶系、脂肪酶系等催化水解相应的底物生成可溶性的多肽、各种氨基酸、各种单糖、双糖、低聚糖、糊精、果胶酸、脂肪酸等等。当然在此催化水解阶段蛋白酶系和淀粉酶系担负着主要催化水解作用。后期发酵增香阶段的根本任务是依靠耐盐酱油微生物通过安全发酵完成增香任务。整个生产周期随着各种复杂的生成物以及中间物进行一系列的复杂的化学反应即非酶化学反应的完成,逐步形成独特的酱油风味,达到确保水解液酱油化。

材料与方法

一、酶制剂

1、BF7658 α -淀粉酶制剂。课题组用固态变温培养法生产,酶活力为2000~2200单位/克。

α -淀粉酶活力测定方法用国家轻工业部颁布的标准方法。

2、AS1398中性蛋白酶制剂。课题组用变温培养法生产,中性蛋白酶活力40000~45000单位/克。

中性蛋白酶活力测定方法用国家轻工业部颁布的标准方法进行。

3、AS3951(沪酿3042)米曲霉制剂。课题组用变温培养法生产,仅中性蛋白酶活力为14000~16000单位/克。

AS3951米曲霉制剂中性蛋白酶活力测定方法同AS1398。

4、AS3350黑曲霉制剂。课题组用变温培养法生产,半纤维素酶活力15000~16000单位/克。

半纤维素酶活力测定方法用中山大学生物系生化教研组编著的《生化技术导论》一书介绍

的方法。

二、发酵增香的酱油微生物

1、产酱香菌1号。

分离自贵州某天然晒酿豆酱的酱泥中。纯培养液含菌数约1.2~1.4亿/毫升。

2、酱油酵母产香2号。

分离自市售的豆瓣酱中,纯培养液含酵母细胞数约1.1~1.2亿/毫升。

3、酱油酵母产酯3号。

分离自贵州某酱菜厂的酱醪中。纯培养液含酵母细胞数约1.1~1.2亿/毫升。

4、酱油乳酸菌4号。

分离自贵州某酱油厂的晒露酱醪中。纯培养液含乳酸菌数约1.3~1.4亿/毫升。

5、酱油乳酸菌5号。

分离自贵州某酱油厂的晒酿豆酱中。纯培养液含乳酸菌数约1.4~1.5亿/毫升。

三、液态多酶协同水解发酵增香法酿造酱油的原料配合。

液态多酶协同水解发酵增香法酿造优质酱油的基本原则一是要求配合好的原料中粗蛋白质含量不宜低于30%;二是要求配合好的原料中的粗淀粉质含量宜在28~30%之间。总之合理的原料配合以及丰富的营养素含量是酿造优质酱油的物质基础。

研究了如下几个原料配合实例(全部以干物质计算):

实例1.配合原料是酱渣30%(含粗蛋白质28%,无氮浸出物10%),豆饼40%、麦麸20%、小麦10%。配合原料含粗蛋白质32.6%和含无氮浸出物30%。

实例2.配合原料是酱渣30%、黄豆40%、金针菇菌丝体(以小麦粒和玉米渣各占50%,接种金针菇菌种培养约30天,菌丝长白长到底为止)20%、碎米10%。配合原料含粗蛋白质30.7%和含无氮浸出物27.8%。

实例3.配合原料是黄豆50%、蘑菇菌丝体(以小麦粒和玉米渣各占50%,接种蘑菇菌种培养约25天,菌丝长白长到底为止)30%、苦荞麦10%、花生8%、海带2%。配合原料含粗蛋

白质32.4%和无氮浸出物32.45%。

实例4. 配合原料是醋渣 30%(含粗蛋白质 26%和无氮浸出物 4%)、豆粕 40%、苦荞麦 30%。配合原料含粗蛋白质31.5%和无氮浸出物31.4%。

四、原料细碎。

细碎原料有两个目的：一是使原料的可溶性物质容易浸出；二是有利于各种酶系分子的渗透、增加更多的切割点，从而加快酶解速度。但是我们在原料粉碎细度研究中，发现100目细度与200目细度比较其原料水解利用率几乎无多少差异，粒径超过200目，调浆的粘度急剧上升，用物理学方法很难调制成浆液，导致机械搅拌极为困难。因此我们认为100~120目细度最宜。含水率低的原料宜用高细度粉碎机细碎。含水率高的原料如酱渣、醋渣、金针菇菌丝体、蘑菇菌丝体、海带宜用高细度磨浆机磨浆。

五、调浆的料水比例。

配合原料调浆的料水比例以1比4~6均可。

六、生物反应器。

生物反应器系设计后不锈钢料制造。

七、主要工艺流程。

细碎原料→配合原料调浆→酶法水解粗淀粉质→预处理蛋白质原料→多酶协同水解蛋白质原料→水解液补盐8~12%→人工接种酱油微生物发酵增香→离心弃渣补盐15~16%→酱油灭菌机巴氏法灭菌→酱油瓶装。

预处理蛋白质主要是继沸点温度作用后，使蛋白质变性，再通过适宜的化学处理方法使蛋白质达到充分变性，成为蛋白酶系分子容易切割的状态，更有利于蛋白酶系催化水解。

在增香发醋期间，产香产醋的酵母菌和乳酸菌的旺盛生长以及产生的乙醇、二氧化碳气体、乳酸以及10%的含盐量都有抑制其它不利微生物生长繁殖的作用。同时含盐量约10%还有助于蛋白质的溶解。快速完成发酵增香后宜用巴氏法不锈钢酱油灭菌机灭菌，使之确保本来的风味和各种营养成分的完整。

结果

一、酱油理化指标的分析测定。

表1中酱油实例编号同上述的原料配合编号。表1的数据为三罐次的平均值。全部理化指标的分析测定方法采用国家轻工业部颁布的标准方法，所用试剂均为分析纯，每个数据是重复三次的平均值。

二、酱油的氨基酸定性的定量分析测定。

酱油的氨基酸定性定量测定结果列入表2。测定用日立35—50的型氨基酸分析仪。

表1 单位：克/100毫升

项 目 酱油 编 号	全氮	氨基酸 态氮	无盐 固形物	还原 糖	总酸 (以乳 酸计)	食盐
1	1.27	0.65	17.10	3.47	2.45	15.67
2	1.22	0.62	16.38	3.25	2.33	15.60
3	1.26	0.64	16.89	3.40	2.41	15.72
4	1.24	0.63	16.65	3.32	2.38	15.40
精制酱油	2.34	1.19	31.35	5.86	4.25	17.66

表2 单位：mg/100ml

种 类	1	2	3	4
天冬氨酸	308.45	305.98	301.37	289.97
苏氨酸	214.25	201.20	208.49	204.39
丝氨酸	267.44	250.72	259.36	253.41
谷氨酸	386.71	380.15	381.58	377.59
甘氨酸	115.74	114.22	112.63	118.47
丙氨酸	163.82	153.10	158.17	155.68
半胱氨酸	74.62	70.60	71.87	68.57
缬氨酸	197.48	188.37	190.53	186.48
蛋氨酸	47.53	41.20	45.47	43.29
异亮氨酸	206.23	197.75	203.41	200.10
亮氨酸	274.55	263.70	270.15	265.09
酪氨酸	130.49	118.56	125.37	120.34
苯丙氨酸	175.82	168.95	171.05	169.00
赖氨酸	193.11	181.62	188.90	184.55
组氨酸	55.42	65.42	54.20	55.60
脯氨酸	177.84	179.94	171.47	169.33
精氨酸	78.31	119.57	93.44	65.80
色氨酸	50.16	56.44	48.92	47.16
胱氨酸	—	—	—	—
羟脯氨酸	存 在	存 在	存 在	存 在
天冬酰胺	存 在	存 在	存 在	存 在
谷氨酰胺	存 在	存 在	存 在	存 在

三、配合原料中主要营养素的利用率。

浸提油后的酱渣取样烘干，用凯氏微量定氮法测定粗蛋白质含量。无氮浸出物含量是用原料所含干物质减去粗蛋白质、粗脂肪、粗纤维和灰分后求得。所用试剂为分析纯，全部数据列于表3。

表3		单位：%			
酱渣编号	1	2	3	4	
项目					
酱渣粗蛋白质	28.5%	2.91%	2.86%	2.90%	
配合料粗蛋白质	32.60%	30.70%	32.40%	31.50%	
配合料粗蛋白质利用率	91.26%	90.52%	91.17%	90.79%	
酱渣含无氮浸出物量	1.85%	1.30%	1.45%	1.40%	
配合料粗淀粉含量	30.05%	27.80%	32.45%	31.40%	
配合料粗淀粉利用率	95.51%	95.32%	95.53%	95.54%	

讨论

一、关于原料利用率。

用液态多酶协同水解发酵增香法酿造酱油，配合原料中主要营养素蛋白质和淀粉质的利用率，如何进一步提高，关键环节有怎样进一步改善水解条件，让底物尽可能充分水解以及浸提萃取或离心分离等，还有待今后继续深入研究解决。

二、关于利用酱渣和醋渣等剩余物再酿造酱油。

本研究证明，用废弃的酱渣（固态低盐法酿造酱油后的剩渣）和醋渣（传统方法酿造食醋后的醋渣）占配合原料中30%，采用液态多酶协同水解发酵增香法酿造酱油是一条就酿造业来说能够尽可能充分利用蛋白质资源的好途径。我国人多地少，蛋白质资源十分紧缺。然而国内许多酿造厂的酱渣和醋渣的粗蛋白质含量高达22~28%，存在着严重的浪费问题。采用传统工艺的酿造厂如能附设用液态多酶协同

水解发酵增香法酿造酱油的车间，把酱、醋渣中的浪费蛋白质资源充分利用起来再酿酱油，不仅可以变废为宝，更主要的是能够显著增加酿造厂的产值和产量，大大降低酱油酿造成本，有效解决不能及时处理的酱渣、醋渣腐烂造成厂区环境严重污染等等问题。

我国目前酱油酿造行业普遍采用的是固态低盐发酵工艺。该工艺对制曲前的大豆饼粕或黄豆要求轧成一定大小的颗粒，从酱油曲霉菌生理要求角度来分析，粒径太小制曲时不能满足酱油曲霉生长呼吸的通透气要求，但粒径太大又不利于蛋白质和淀粉等营养素的充分酶解及浸出。这可能是传统工艺中一个很难圆满解决的矛盾。而选用液态多酶协同水解（在生物反应器内）继后发酵增香法速酿酱油则正是再利用酱、醋渣酿造酱油的比较理想的工艺。

参考文献

- 〔1〕 邹亮、徐贤娟：《生物工程酱油研究总结报告》，内部资料，未发表。1988年9月。
- 〔2〕 邹亮、徐贤娟：《薯渣作淀粉质辅料用多酶水解发酵增香法酿造酱油》，内部资料，未发表。1988年9月。
- 〔3〕 钱铭镛：《酱油的简易制法——酶解法》，食品科学杂志，1986年3期。
- 〔4〕 张树政主编：《酶制剂工业》，科学出版社，1984年。
- 〔5〕 王瑛等编著：《调味品加工与检验》，上海科学技术出版社，1987年。
- 〔6〕 中山大学生物系生化教研组编著：《生化技术导论》，1978年。
- 〔7〕 无锡轻工业学院等合编：《食品分析》，轻工业出版社，1985年8月。
- 〔8〕 冯兰庄编著：《酱油生产问答》，轻工业出版社，1987年5月。
- 〔9〕 管敦仪主编：《啤酒工业手册》上、中册，轻工业出版社，1986年。
- 〔10〕 张根旺、刘景顺：《植物油副产品的综合利用》，河南科学技术出版社，1982年。
- 〔11〕 梁鸿秋等：《谷物籽粒中色氨酸的快速测定法》，氨基酸杂志，1988年1期。
- 〔12〕 张力田：《淀粉糖》，轻工业出版社，1986年。
- 〔13〕 王宜庆：《玉米淀粉和高果糖浆》，中国食品出版社，1987年。
- 〔14〕 中国酿造（双月刊），中国微生物学会酿造学会编。
- 〔15〕 包启安编著：酱油酿造。
- 〔16〕 陈吉泰等：《酱油中香气成分的分析》，天津轻工业学

院学报, 1987 年 1 期。

〔17〕 无锡轻工业学院等合编: 微生物学, 轻工业出版社, 1987 年。

〔18〕 华南工学院等编著: 发酵工程与设备, 轻工业出版社, 1987 年。

〔19〕 沈同、王镜岩、赵邦梯主编: 生物化学, 高等教育出版社, 1987 年。

〔20〕 白毓谦等: 微生物学实验技术, 山东大学出版社, 1987 年。

〔21〕 陶慰孙等编著: 蛋白质分子基础, 高等教育出版社, 1985 年。

〔22〕 杨庆尧编著: 食用菌生物学基础, 1981 年 1 月。

〔23〕 程皆能主编: 微生物生理学, 1987 年 6 月。

〔24〕 森治彦等: 《酱油发酵中耐盐酵母的选择计数方法》, 朱成摘译, 应用微生物, 1986 年 3 期。

〔25〕 水沼武二: 《酱油酿造微生物学的进展》, 林北海、王斌译, 应用微生物, 1988 年 1 期。

〔26〕 C.H. Brooks 等: 发酵罐无菌和密封的统一设计方法, 毛维颖译, 应用微生物, 1988 年 2 期。

〔27〕 胡学智: 国内外酶制剂工业概况, 应用微生物,

1982 年 1 期。

〔28〕 Saul L. Neidleman, 生物催化作用在生物工程中的应用, 虞和慈译, 应用微生物, 1985 年 4 期。

〔29〕 小林猛: 食品工业中的生物工程, 施一平、王熙萍译, 应用微生物, 1985 年 6 期。

〔30〕 张柏青: 乳酸菌的保藏方法, 应用微生物, 1982 年 5 期。

〔31〕 陆刚译: 酱油的无盐酿造方法, 应用微生物, 1983 年 4 期。

〔32〕 Yoshiyuki Nomura, Masayoshi Iwahara and Motoyoshi Hongo, Lactic Acid Production by Electrodialysis Fermentation Using Immobilized Growing cell, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 30, P. 788—793(1987)

〔33〕 Berger, R.G., Neuhauser, K., and Drawert, F., Biotechnological Production of Flavor Compounds, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 30, P. 687—990(1987)

〔34〕 G. G. Birch, ENZYMES AND FOOD PROCESSING, (1981)。

肉类发酵混合培养菌种的选择

摘要

适用于研究肉类发酵混合培养的菌种有: 啤酒小球菌(*P. cerevisiae*)、乳酸小球菌(*P. acidilactic*)、胚芽乳杆菌(*L. Plantarum*)、干酪乳酸杆菌(*L. casei*)和变异细球菌(*M. Varians*)。培养基中加入 0.18% 的亚硝酸盐呈现微弱的抑制性, 而加入 7% 的混合香料对酸的产生却具有一定的刺激作用。乳酸杆菌和小球菌之间有明显的拮抗作用。变异细球菌对其他菌种未产生抑制性物质, 并对乳酸杆菌和小球菌产生的细菌素不敏感。拮抗作用在混合酸化实验中通过圆盘测定进一步得以证实, 而一些快速酸化菌株混合培养未取得成功。

一、引言

一些特制肉食品、香肠, 是通过发酵加工而制成的。发酵给肉类带来很多好处, 尤为重要是抑制了病原微生物的生长, 增强了食品的防腐能力。

肉类发酵中应用的细菌大都是乳酸杆菌属小球菌属和细球菌属的菌种。这些菌种是根据

其耐受食盐和亚硝酸盐、生长温度、风味形成以及不合或毒性化合的原则进行选择。菌种选择的依据还包括酸化率, 肉类可用单一的菌种来发酵, 乳类发酵中, 经过菌株相容性试验可以选用乳酸菌进行混合培养, 但至今我们还没有发现任何有关肉类发酵培养的系统性研究。有不少资料报告了乳酸杆菌和小球菌产生的细菌素, Anderson 和 Daeschet(1987) 报告说, 胚芽乳杆菌产生的细菌素能抑制小球菌, 这说明在肉类发酵中, 菌种间能发生抵抗作用。混合培养还有保护菌种, 避免噬菌体侵袭的优点。

这项工作的目的就是研究肉类发酵所用菌种间的拮抗性和共生现象, 以寻求相容性混合培养的菌种。

二、材料和方法

1 菌种

干酪乳酸杆菌*4008、胚芽乳杆菌*4166 和*4003、变异细球菌*4168、乳酸小球菌*